

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-201688

(P2000-201688A)

(43) 公開日 平成12年7月25日 (2000.7.25)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/72		C 0 7 K 14/72	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/02	C 4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 N 5/00	B 4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 23 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-98787

(22) 出願日 平成11年4月6日 (1999.4.6)

(31) 優先権主張番号 特願平10-319465

(32) 優先日 平成10年11月10日 (1998.11.10)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002093

住友化学工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72) 発明者 大下 博文

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住化テ

クノサービス株式会社内

(72) 発明者 徐 明旭

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住化テ

クノサービス株式会社内

(74) 代理人 100093285

弁理士 久保山 隆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エストロジェンレセプター遺伝子およびその利用

(57) 【要約】

【課題】 化学物質のエストロジェン様作用を測定するための方法として、化学物質のエストロジェンレセプター活性化能を評価するための試験系を提供可能とすること。

【解決手段】 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロジェンレセプター遺伝子等。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロゲンレセプター遺伝子。

【請求項2】配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするエストロゲンレセプター遺伝子。

【請求項3】配列番号2で示される塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子。

【請求項4】配列番号4で示される塩基配列からなるエストロゲンレセプター遺伝子。

【請求項5】請求項1～4記載のエストロゲンレセプター遺伝子を含有するベクター。

【請求項6】エストロゲンレセプター遺伝子に宿主細胞で機能可能なプロモーターが機能可能な形で結合されてなる請求項5記載のベクター。

【請求項7】請求項1～4記載のエストロゲンレセプター遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項8】請求項5または6記載のベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項9】宿主細胞が動物細胞である請求項7または8記載の形質転換体。

【請求項10】請求項7～9記載の形質転換体を培養してエストロゲンレセプターを産生させ、これを回収することを特徴とするエストロゲンレセプターの製造方法。

【請求項11】配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

【請求項12】化学物質のエストロゲンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイにおいて、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と請求項1～4記載のエストロゲンレセプター遺伝子とがエストロゲンレセプター非内在性宿主細胞に導入されてなる形質転換体に、化学物質を作用させることを特徴とする化学物質のエストロゲンレセプター活性化能の評価方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エストロゲンレセプター遺伝子およびその利用に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】近年、環境中の幾つかの化学物質がエストロゲン様作用を示すことが報告されている。かかる化学物質の作用は

2

性化され、染色体上のエストロゲン応答配列に結合して該配列の下流に在する遺伝子の発現を促進する。そこで、化学物質のエストロゲン様作用を測定するための方法として、化学物質のエストロゲンレセプター活性化能を評価するための試験系の開発が切望されている。

【0003】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、水生動物のモデル動物であるメダカのエストロゲンレセプターをコードする遺伝子を見出し、本発明に至った。即ち、本発明は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロゲンレセプター遺伝子（以下、本発明遺伝子と記す。）、配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする該遺伝子、配列番号2で示される塩基配列を有する該遺伝子、配列番号4で示される塩基配列からなる該遺伝子、該遺伝子を含有するベクター（以下、本発明ベクターと記す。）、該遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体（以下、本発明形質転換体と記す。）、該形質転換体を培養してエストロゲンレセプターを産生させ、これを回収することを特徴とするエストロゲンレセプターの製造方法、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター、化学物質のエストロゲンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイにおいて、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と本発明遺伝子とがエストロゲンレセプター非内在性宿主細胞に導入されてなる形質転換体に、化学物質を作用させることを特徴とする化学物質のエストロゲンレセプター活性化能の評価方法、を提供するものである。

【0004】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明遺伝子は、例えば、ヒメダカ等のメダカから、J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis著：モレキュラー クローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリング ハーバー ラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）発行、1989年等に記載の遺伝子工学的方法に準じて取得することができる。具体的には、まず、ヒメダカ等のメダカからRNAを調製する。例えば、ヒメダカの内臓を塩酸グアニジンやグアニジンチオシアネート等の強力な蛋白質変性剤を含む溶液中で粉砕し、さらに該粉砕物にフェノール、クロロホルム等を加えることにより蛋白質を変性させる。変性蛋白質を遠心分離等により除去した後、回収されたRNAを精製する。精製したRNAは、イソゲン（Isogen）法

として化学物質のエストロゲン様作用を測定する試みがなされている。エストロゲンの作用機序として、エストロゲンがエストロゲンの標的細胞に存在するエストロゲンレセプターに結合すると、該レセプターは活

1法等の方法により全RNAを抽出する。なお、これらの方法に基づいた市販のRNA調製用キットとしては、例えばISOGEN（ニッポンジエー製）がある。得られた全RNAを鋳型として使用し、該RNAにオリゴdTプライ

3

イマーをアニールさせた後に逆転写酵素を作用させることにより一本鎖cDNAを合成し、次いで、該一本鎖cDNAに大腸菌RNase Hおよび大腸菌のDNAポリメラーゼIを作用させて二本鎖のcDNAを合成する。更に該cDNAの両末端をT4 DNAポリメラーゼにより平滑化する。得られたcDNAはフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿等の通常の方法により精製し、回収する。なお、これらの方法に基づいた市販のcDNA合成用キットとしては、例えばcDNA合成システムプラス（アマシャム社製）がある。このようにして得られたcDNAを例えば、プラスミドpUC118やファージλgt11などのベクターにリガーゼを用いて挿入することによりcDNAライブラリーを作製する。次に、このようなcDNAライブラリーから、例えば、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するDNA断片をプローブとして用いるハイブリダイゼーション法や、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCR法により、本発明遺伝子を取得することができる。また、上記のようにして調製された全RNAを鋳型に使用して逆転写反応を行なった後、得られたDNAを鋳型にしてPCRを行なうことにより（RT-PCR法）本発明遺伝子を取得することもできる。上記のPCR法またはRT-PCR法においてPCRにより本発明遺伝子を増幅する際に用いるプライマーとしては、例えば、20bpから40bp程度の長さでかつGまたはC塩基の割合が40%から70%程度の塩基配列を、配列番号2で示される塩基配列の5'末端領域および3'末端領域からそれぞれ選択し、該塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成するとよい。具体的には、例えば、フォワードプライマーの塩基配列としては5'-ATG TAC CCT GAA GAG AGC CGG G-3'や5'-AAG CTCAT GAG TAA GAG ACA GAG C-3'があげられ、リバースプライマーの塩基配列としては5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3'があげられる。このようにしてPCRで増幅された本発明遺伝子は、例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis著；モレキュラー クローニング 第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリングハーバー ラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）発行、1989年等に記載の遺伝子工学的の方法に準じてベクターにクローニングすることからできる。具体的には例えば、TAクローニングキット（Invitrogen社）やpBluescriptII（Stratagene社）などの市販のプラスミドベクターを用いてクローニングすることができる。尚、本発明遺伝子は、配列番号2や配列番号

4

60、1977 等に記載される）やSanger法（例えばSanger, F. & A. R. Coulson, J. Mol. Biol., 94, 441, 1975, Sanger, F. & Nicklen and A. R. Coulson., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977等に記載される）に準じて解析することにより確認することができる。

【0005】このようにして取得される本発明遺伝子を、例えば、宿主細胞内で複製可能なDNAであって、宿主細胞からの単離、精製が可能であり、検出可能なマーカー遺伝子をもつベクターに、通常の遺伝子工学的手法を用いて組込むことにより本発明ベクターを構築することができる。本発明ベクターの構築に用いることができるベクターとしては、具体的には、微生物である大腸菌を宿主細胞とする場合、例えば、プラスミドpUC119（宝酒造（株）製）や、ファージミドpBluescriptII（ストラタジーン社製）等をあげることができ、酵母を宿主細胞とする場合は、プラスミドpACT2（Clontech社製）などをあげることができる。また、哺乳類動物細胞を宿主細胞とする場合は、pRC/RSV、pRC/CMV（Invitrogen社製）等のプラスミド、ウシバビローマウイルスプラスミドpBPV（ファルマシア社製）、EBウイルスプラスミドpCEP4（Invitrogen社製）等のウイルス由来の自律複製起点を含むベクター、ワクシニアウイルス等のウイルスなどをあげることができ、昆虫類動物細胞（以下、昆虫細胞と記す。）を宿主細胞とする場合は、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスをあげることができる。バキュロウイルスやワクシニアウイルス等のウイルスに本発明遺伝子を組込むには、使用しようとするウイルスのゲノムと相同な塩基配列を含有するトランスファーベクターを用いる。このようなトランスファーベクターの具体的例としては、Pharmingen社から市販されているpVL1392, pVL1393（Smith, G. E., Summers M. D. et al.: Mol. Cell. Biol., 3, 2156-2165, 1983）、pSF85（Funahashi, S. et al., J. Virol., 65:5584-5588, 1991）などのプラスミドをあげることができる。本発明遺伝子を前記のようなトランスファーベクターに挿入し、該トランスファーベクターとウイルスゲノムとを同時に宿主細胞に導入すると、トランスファーベクターとウイルスゲノムとの間で相同組換えが起こり、本発明遺伝子がゲノム上に組み込まれたウイルスを得ることができる。ウイルスゲノムとしては、Baculovirus, Adenovirus, Vacciniavirusなどのゲノムを用いることができる。本発明遺伝子の上述に、宿主細胞で機能可能なプロモーターを機能可能な形で結合させ、これを上述のようなベクターに組み込むことにより、本発明遺伝子を宿主細胞で発現させることの可能な本発明ベク

0, 105, 1984）等の通常の方法に準じて、核酸の化学合成を行うことにより調製することもできる。得られた本発明遺伝子の塩基配列は、Maxam-Gilbert法（例えば、Maxam, A. M. & W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5

50）は、本発明遺伝子が導入される宿主細胞においてプロモーターの制御下に発現するように、該プロモーターと本発明遺伝子とを結合させることを意味する。使用するプロモーターは、一重質転換する宿主細胞内でプロモータ

5

一活性を示すものであれば特に制限はなく、例えば、宿主細胞が動物細胞や分裂酵母である場合は、例えば、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、シミアンウイルス (SV40) の初期もしくは後期プロモーター、マウス乳頭腫ウイルス (MMTV) プロモーター、単純ヘルペスウイルス (HSV) のチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子プロモーター等をあげることができる。宿主細胞が出芽酵母である場合は ADHI プロモーターなどをあげることができる。また、宿主細胞において機能するプロモーターをあらかじめ保有するベクターを使用する場合は、ベクター保有のプロモーターと本発明遺伝子が機能可能な形で結合するように、該プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すればよい。例えば、前述のプラスミド pRC/RSV、pRC/CMV 等は、動物細胞で機能可能なプロモーターの下流にクローニング部位が設けられており、該クローニング部位に本発明遺伝子を挿入し動物細胞へ導入すれば、本発明遺伝子が発現する。これらのプラスミドにはあらかじめ SV40 の自律複製起点 (ori) が組み込まれているため、ori (−) の SV40 ゲノムで形質転換された培養細胞、例えば COS 細胞等に該プラスミドを導入すると、細胞内でプラスミドのコピー数が非常に増大し、結果として該プラスミドに組み込まれた本発明遺伝子を大量発現させることもできる。また、前述の酵母用プラスミド pACT2 は ADHI プロモーターを有しており、該プラスミドまたはその誘導体の ADHI プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すれば、本発明遺伝子を例えば CG1945 (Clontech 社製) 等の出芽酵母内で大量発現させることが可能な本発明ベクターが構築できる。

【0006】上述のようにして構築された本発明ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明形質転換体を取得することができる。本発明ベクターを宿主細胞へ導入する方法は、形質転換される宿主細胞に応じて通常用いられる方法でよい。例えば、大腸菌を宿主細胞とする場合は、「モレキュラー・クローニング」(J. Sambrook 等、コールド・スプリング・ハーバー、1989 年)等に記載される塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等を用いることができ、酵母菌を宿主細胞とする場合は、例えばリチウム法に基づく Yeast transformation kit (Clontech 社製) などを用いてベクターを導入することができる。また、哺乳類動物細胞や昆虫細胞等の動物細胞を宿主細胞とする場合は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、エレクトロポレーション法、またはリポファクション法等により該宿主細胞に本

導入法によりウイルスゲノムを宿主細胞に導入できるほか、ウイルスゲノムを含有するウイルス粒子を宿主細胞へ感染させることによってウイルスゲノムを宿主細胞に導入することができる。

6

【0007】本発明形質転換体の選抜は、導入された本発明ベクターが有する検出マーカー遺伝子の性質に応じた方法を用いればよい。例えば、検出マーカー遺伝子が、細胞致死活性を示す薬剤に対する耐性遺伝子である場合には、該薬剤を添加した培地を用いて、本発明ベクターを導入した細胞を培養すればよい。このようにして用いることのできる薬剤耐性遺伝子と選抜薬剤との組み合わせとしては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子とネオマイシンの組合せ、ハイグロマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシンの組合せ、ブラストサイジン S 耐性遺伝子とブラストサイジン S との組合せ等をあげることができる。また、検出マーカー遺伝子が、宿主細胞の栄養要求性を相補する遺伝子である場合には、該栄養素を含まない最少培地を用いて、本発明ベクターを導入した細胞を培養すればよい。さらに、本発明発現ベクターを導入した場合は、エストロジェン結合活性に基づく検出方法を用いることもできる。本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得するには、例えば、本発明ベクターを制限酵素等で消化することにより直鎖上にした後、これを前述の方法で宿主細胞へ導入して該細胞を通常数週間培養し、導入された本発明ベクターにコードされる検出マーカーを指標にして目的とする形質転換体を選抜すればよい。例えば、上記のような選択薬剤に対する耐性遺伝子を検出マーカー遺伝子として持つ本発明ベクターを前述の方法で宿主細胞に導入し、選択薬剤を添加した培地で数週間以上該細胞を継代培養して、コロニー状に生き残った選択薬剤耐性クローンをピペットで吸い上げ純化することにより、本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得することができる。該形質転換体は、凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することできるので、一過性の遺伝子導入株と比較して、形質転換体作製の手間を省くことができ、形質転換体の性能を一定に保つこともできる。

【0008】上述のようにして得られた本発明形質転換体を培養することにより本発明のエストロジェンレセプターを産生させることができる。例えば、本発明形質転換体が微生物である場合、該形質転換体は、一般微生物における通常の培養に使用される炭素源や窒素源、有機ないし無機塩等を適宜含む各種の培地を用いて培養すればよい。培養は、一般微生物における通常の方法に準じて行い、固体培養、液体培養 (試験管振とう式培養、往復式振とう培養、ジャーファーメンター (Jar Fermentor) 培養、タンク培養等) 等が可能である。培養温度

養するとよい。培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通常約 1〜約 5 日間である。また、上記形質転換体が動物細胞である場合、一般の培養細胞における通常の培養に使用される培地を用いて培養すればよい。選

7

択薬剤を利用して当該形質転換体を選抜した場合は、対応する選択薬剤を共存させて培養するのが望ましい。哺乳類動物細胞の場合、例えば10v/v%となるようFBSを添加したDMEM培地等の培地を用いて、37℃、5v/v%CO<sub>2</sub>存在下等にて、培地を数日ごとに交換しながら培養する。細胞がコンフルエントになるまで増殖したら、0.25w/v%程度のトリプシンPBS溶液を用いて個々の細胞に分散させ、数倍に希釈して新しい培養容器に播種し培養を続ける。目的とする量まで細胞が増殖したら細胞を集める。昆虫細胞の場合も同様に、10v/v%FBSおよび2w/v%Yeastlateを含むGrace's medium等の昆虫細胞用培地を用いて25℃から35℃で継代培養する。ただし、Sf21細胞などの培養容器からはかれやすい細胞の場合は、トリプシン液ではなくピペッティングにより細胞を分散させ継代を行なう。また、Baculovirus等のウイルスベクターを含む形質転換体の場合は、細胞質効果により細胞が死滅する前、例えば培養開始から72時間目までに培養を終了することが好ましい。本発明形質転換体により産生されたエストロゲンレセプターの回収は、適宜、通常の単離、精製の方法を組み合わせて行えば良

く、例えば、培養終了後、形質転換体の細胞を遠心分離等で集め、該細胞を通常のバッファー、例えば、20mM HEPES pH7.1mM EDTA、1mM DTT、0.5mM PMSFからなるバッファー等に懸濁した後、ポリトロン、超音波、ダウンスホモジナイザー等を用いて細胞を破碎し、破碎液を数万xgで数十分から1時間程度超遠心分離し、上清画分を回収することにより、エストロゲンレセプターを含む画分を得ることができる。さらに、前記上清画分をイオン交換、疎水、ゲルろ過、アフィニティ等の各種クロマトグラフィーに供することにより、より精製されたエストロゲンレセプターを回収することもできる。この際、後述のエストロゲンレセプターが結合する塩基配列を含む15bpから200bp程度の長さのオリゴヌクレオチドをプローブとしたDNA結合アッセイなどにより、目的とするエストロゲンレセプターを含む画分を見分けることができる。このようにして製造された本発明のエストロゲンレセプターは、例えば、エストロゲンレセプターに対する化学物質の親和性を測定するためのラジオレセプターアッセイ等に用いることができる。

【0009】上述のようにして構築された本発明発現ベクターは、例えば、化学物質のエストロゲンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイに利用することができる。具体的には、エストロゲン応答配列を有しエストロゲンレセプターにより転写が制御さ

8

一するためのレポーター遺伝子として用いる。エストロゲン応答配列 (estrogen response element) とは、エストロゲンにより転写が制御される遺伝子のプロモーターの上流に存在し、エストロゲンレセプターによって認識される塩基配列を意味する。エストロゲンの結合したエストロゲンレセプターは活性化されてエストロゲン応答配列に結合することにより、該配列の下流にある遺伝子の転写を促進する。エストロゲン応答配列のコンセンサス配列としては、塩基配列 AGGTCAXXX TGACCT (Xは、A、G、C、またはTを意味する。) が一般に知られている。レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、βガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、成長ホルモン遺伝子などが利用できる。上述のように作製した本発明発現ベクターと、本キメラ遺伝子を組み込んだベクターとを、内在性のエストロゲンレセプターを産生していない宿主細胞、例えばHeLa細胞やNIH3T3細胞などに導入し形質転換体を取得する。この形質転換体をそのまま1日から数日間培養する間に、例えばエストロゲン様作用をもつ化学物質を培地中に加えて前記形質転換体に作用させる。該形質転換体が産生するエストロゲンレセプターが化学物質の結合により活性化された場合は、レポーター遺伝子のmRNAへの転写が促進され、ルシフェラーゼ酵素蛋白質が形質転換体の細胞内に蓄積する。この状態の形質転換体を破碎して細胞粗抽出物を調製し、レポーターの酵素活性等を指標にして細胞当たりのレポーター蛋白質の量を求める。例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合、前記細胞粗抽出物にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えると発光し、発光量はルシフェラーゼ量に比例する。従って、この発光量をルミノメーター等の測定装置で測定することにより、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量がわかり、よって、その際に添加されていた化学物質のエストロゲンレセプター活性化能を評価することができる。また、本発明発現ベクターと、本キメラ遺伝子が組み込まれたベクターとを同時に宿主細胞に導入して、本発明遺伝子および本キメラ遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体を取得し、上記レポーターアッセイに用いてもよい。該形質転換体は凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することできるので、これを一旦取得すると、アッセイの度ごとにこれらの遺伝子を宿主細胞に導入して新たな形質転換体を取得する必要が無く、また、形質転換体の性能を一定に保つことでも

有用である。

【0010】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるもの

す。また、エストロゲン応答配列の下流に転写開始に必要な塩基配列とレポーター遺伝子とを結合させたキメラ遺伝子 (以下、本キメラ遺伝子と記す。) を、細胞内でのエストロゲンレセプターの転写調節能をモニタ

9

ではない。

【0011】実施例1（本発明遺伝子の取得）  
 餌（コイ稚魚用）に $\beta$ -エストラジオール（和光純薬工業株式会社製）10mg/lを10mg/g餌となるように添加し、これにアセトンを加えてよく混和した後、ヘアードライヤーの下でアセトンを除去した。こうして得た処理餌を、約3ヶ月のヒメダカ雌10個体に3回/日の頻度で1日間飽食量与えた。 $\beta$ -エストラジオール投与24時間後に、これらのヒメダカから内臓を摘出し、直ちに組織1

XU1: 5'-ATG TAC CCT GAA GAG AGC CGG G-3' (22mer, GC/AT = 13/9)

XU14: 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

次いで、前記RT-PCRで得られたDNA断片をpCR2.1 (TA cloningベクター)にサブクローニングして大腸菌DH5- $\alpha$ に導入し、プラスミドを調製した(pCR-ER)。pCR2.1の塩基配列に基づくプライマーおよび上記のプライマー(XU1, XU14)を用い、ABI sequence systemで、前記のpCR-ERにクローニングされたDNA断片の塩基配列を決定した。その結果、配列番号2で示される塩基配列が明らか

XU36: 5'-AAG CTT CAT GAG TAA GAG ACA GAG C-3' (25mer GC/AT = 11/14)

XU14: 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

次いで、前記RT-PCRで得られたDNA断片をpCR2.1 (TA cloningベクター)にサブクローニングして大腸菌DH5- $\alpha$ に導入し、プラスミドを調製した(pCR-ER2)。pCR2.1の塩基配列に基づくプライマーおよび上記のプライマー(XU36, XU14)を用い、ABI sequence systemで、前記のpCR-ER2にクローニングされたDNA断片の塩基配列を決定した。その結果、配列番号4で示される塩基配列が明らかとなった。

【0012】実施例2（本発明遺伝子発現用ベクターの構築）

実施例1で得られたプラスミドpCR-ERからエストロジェンレセプター遺伝子を $\lambda$ ba1とHind IIIで切り出し、同じ制限酵素で消化した発現ベクターpRc/RSVに組みこみ、エストロジェンレセプターを発現させるための発現

オリゴヌクレオチド1:

5'-CCA AAG TCA GGT CAC AGT GAC CTG ATC AAA GGA AC-3'

オリゴヌクレオチド2:

5'-CTT TGA TCA GGT CAC TGT GAC CTG ACT TTG GGT TC-3'

両オリゴヌクレオチドの末端をカイネーションによりリン酸化した。カイネーション反応液は、10 nmolのオリゴヌクレオチド1または10 nmolのオリゴヌクレオチド2、2.5  $\mu$ lの10 Xカイネーションバッファー、1  $\mu$ lの10 mMのATP、2.5  $\mu$ lのオリゴヌクレオチドキナーゼ（宝酒造社製）を1.5 ml容チューブに採り、滅菌蒸留水

10

gあたり10mlのトリソール試薬を加えてホモジナイズした後、クロロホルムを加えて遠心分離した。水相を採取してイソプロパノールを加えRNAを沈澱させた。約0.3g約500  $\mu$ gのRNAが得られた。このようにして調製したRNA1  $\mu$ gを鋳型とし、ランダム9merプライマーを用い、予め30℃で10分間逆転写反応を行い、引き続き42℃で50分間逆転写反応を行った。続いて下記のプライマー(XU1とXU14)を用いPCR(30サイクル、94℃ 30sec-1min、50-60℃ 1-1.5min、72℃ 1-3min)を行った。

となった。また、上記のようにして調製したRNA1  $\mu$ gを鋳型とし、ランダム9merプライマーを用い、予め30℃で10分間逆転写反応を行い、引き続き42℃で50分間逆転写反応を行った。続いて下記のプライマー(XU36とXU14)を用いPCR(30サイクル、94℃ 30sec-1min、50-60℃ 1-1.5min、72℃ 1-3min)を行った。

ベクターRSV-ERを構築した。具体的な過程を図1に、発現ベクターRSV-ERの構造の詳細を図2示す。また、同様にして、実施例1で得られたプラスミドpCR-ER2からエストロジェンレセプター遺伝子を $\lambda$ ba1とHind IIIで切り出し、同じ制限酵素で消化した発現ベクターpRc/RSVに組みこみ、エストロジェンレセプターを発現させるための発現ベクターRSV-ER2を構築した。

【0013】実施例3（エストロジェンレセプターに応答するレポーター遺伝子を有するベクターの構築）  
 30 既知のセノプスのA2ピテロジェニン遺伝子(GenBank Accession No. X00205)の5'末端領域のエストロジェン応答配列(以下、EREと記す。)のコンセンサス配列をもとに、下記のオリゴヌクレオチド1およびオリゴヌクレオチド2を合成した。

ープに加え、95℃で5分間保温し、60℃、次いで37℃にてそれぞれ1時間保温した後、室温で約1時間放置した。反応終了後、10  $\mu$ lのアニーリング反応液に10  $\mu$ lのDNAリガーゼ（ライゲーションキット、宝酒造社製）を加え、2本鎖のERE断片を連結した。反応液をアガロースゲル電気泳動に供してDNA断片の長さを分析し、ERE

と判断されるDNA断片(以下、5' X ERE断片と記す)をそれぞれ回収した。これらのDNA断片をフラメンティングキット（宝酒造社製）を用い、末端を平滑化した。一方、pBluescript (SK-)を制限酵素EcoR I（宝酒

11

造社製)で切断し、5'末端をアルカリフォスファターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。前記のDNA断片(4 X ERE断片または5 X ERE断片)とpBluescript(SK-)とをそれぞれDNAライゲーションキットを用いて結合した。

得られた反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ のコンピテントセル(東洋紡社製)を形質転換してアンピシリン耐性となった株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、塩基配列をABI PRISM<sup>TM</sup>377 DNA Sequence System(パーキンエルマージャパン社製)で確認した。次に、HSV tkプロモーター配列を持つベクターpTK $\beta$ (クロンテック)を制限酵素Sal IおよびXho I(それぞれ宝酒造社とニッポンジーン社製)で切断した後アガロースゲル電気泳動で分析し、約1 kbpのtkプロモーター断片を得た。該断片をプランティングキットを用い、末端を平滑化した。一方、ルシフェラーゼ遺伝子を持つレポータープラスミドpGL-3(ピッカジーン)を制限酵素Sma I(宝酒造社製)で切断し、5'末端をアルカリフォスファターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。2つのDNA断片をDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ のコンピテントセル(東洋紡)を形質転換してアンピシリン耐性となった株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、tkプロモーター挿入したレポータープラスミド(tk-pGL-3)を取得した。次に、上記の4 X ERE断片が挿入されたpBluescriptを制限酵素Kpn IおよびXba I(それぞれ宝酒造社とニッポンジーン社製)で切断し、アガロースゲル電気泳動で4 X ERE断片を回収した。一方、tk-pGL-3をKpn IおよびNhe I(いずれも宝酒造社製)で消化し、5'末端をアルカリフォスファターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。このようにして調製された4 X ERE断片とtk-pGL-3とをDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 $\alpha$ 株のコンピテントセル(東洋紡)を形質転換してアンピシリン耐性となった株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、4 X ERE断片およびtkプロモーター断片を保有するレポータープラスミド(ERE-tk-pGL)を取得した。該プラスミドの構築の過程を図3に、該プラスミドの構造を図4に示す。また、同様にして、上記の5 X ERE断片が挿入されたpBluescriptから5 X ERE断片を回収し、該断片と、Kpn IおよびNhe Iで消化されたtk-pGL-3とを結合させ、5 X ERE断片およびtkプロモーター断片を保有するレポータープラスミド(ERE5-tk-pGL)を取得した。

#### 【0014】実施例4(プラスミドDNAの大量調製)

トータルレポータープラスミドであるpRL-tk(ピッカジーン)のDNAを以下の方法より大量に調製した。上記プラスミドを含む大腸菌をアンピシリン(終濃度10 $\mu$ g/ml)を含有LB培地3mlに接種し、37 $^{\circ}$ Cで一晩振動培養した。そ

12

の培養液をアンピシリン(50 $\mu$ g/ml)を含むLB培地200mlに接種し、一晩振動培養した。一晩培養後の菌体を5,000 rpm, 10分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心分離し(CR21、日立工機)、得られた沈澱を0.1 MのSTEバッファー60 mlに懸濁し、同条件で再度遠心分離した。沈澱を3 mlのsolution 1に懸濁し、1 mlのリゾチーム(20 mg/ml)を加え、室温で5分間放置した。引き続き10 mlのSolution 2を加え、氷上に10分間放置した後、7.5 mlのsolution 3を加え、氷上に15分間放置した。12,000 rpm, 20分、4 $^{\circ}$ Cで遠心分離し、上清を50 mlチューブに移し、0.6容量のイソプロピルアルコールを加え、室温で15分間放置した。3,000 rpm, 10分間、室温で遠心分離し(CR5DL、日立工機)、70%エタノールで洗浄し、乾燥させた。沈澱を4.2 mlのTEバッファーに溶かし、5 mg/ml Rnase溶液(ニッポンジーン)を28 $\mu$ l加え、50 $^{\circ}$ C、30分間インキュベートした。2 mg/mlエチジウムブロマイド溶液400 $\mu$ lとCsCl(関東化学)4.6 gを加えた後、日立工機シールチューブに移し、55,000 rpm, 20 $^{\circ}$ C、16時間遠心分離(SCP85H2、日立工機)した。スーパーコイルドプラスミドDNAのバンドを注射筒で抜き取り、55,000 rpm, 20 $^{\circ}$ C、16時間再度遠心分離した。再びスーパーコイルプラスミドDNAのバンドを注射筒で抜き取り、水飽和イソアミルアルコールでエチジウムブロマイドを完全に除き、一晩5 mM STEバッファーに透析した後、試料として用いた。

#### 【0015】実施例5(細胞の培養)

不活化済み牛胎仔血清(GIBCO-BRL、米国)を活性炭-デキストランで処理し、細胞培養の培地作製に用いた。処理過程における各ステップは以下の通りであった。25 Mスクロース(和光純薬)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>(和光純薬)、10 mM HEPES(pH7.4)(同仁化学、熊本)1L中にノーリットEXW(ナカライテスク)2.5gとデキストランT-70(ファルマシアハイオテック、スウェーデン)0.25gを懸濁し、4 $^{\circ}$ Cで終夜攪拌した。本懸濁液を12,000 rpmで10分遠心(CR21、日立工機)して活性炭を沈殿させた。これを不活化済み牛胎仔血清(GIBCO-BRL、米国)1Lに懸濁し、4 $^{\circ}$ Cで終夜攪拌した。その後、12,000 rpmで10分遠心(CR21、日立工機)して活性炭を沈殿させ、取り除いた。以上の操作を2回繰り返した後、ザルトラブV500(0.20 $\mu$ m、ザルトリウス、独国)を用いてフィルター過したる液を活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清とした。ヒト子宮癌細胞株HeLa(大日本製薬製)を、10%活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清、0.03% L-グルタミン(日本製薬)および0.15% 炭酸水素ナトリウムを添加したイーザルMEM(日本製薬)培地

PBS(-)(日本製薬)で接着した細胞を洗浄し、PBS(-)80 mlに5%トリプシン(DIFCO、米国)10 ml、0.2% EDTA $\cdot$ 3 Na(同仁化学)10 mlを添加した液を用いて細胞を剥離した。細胞の培養はすべて5% CO<sub>2</sub>および飽和湿度下、37 $^{\circ}$ C

13

てCO<sub>2</sub>インキュベータ（アステック）内で培養した。

【0016】実施例6（レポーターアッセイ）

以下の操作を各条件ごとに4連で実験を行った。実施例5で培養した細胞の培地を除去し、PBS(-)で1回洗浄した。5%トリプシン(DIFCO, 米国) 5 mlを加え、細胞を剥離した。細胞の計数した後24ウェルマルチウェルプレート(ファルコン)に播種した。細胞を1ウェルあたり40,000個のHeLa細胞を播種した。1ウェルあたり0.5 mlの10% 活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清含有培地を添加し翌日まで培養した。トランスフェクションは1ウェルあたり0.25~1.0  $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.1~0.5  $\mu$ gのレポータープラスミドERE-tk-pGLまたはERE5-tk-pGL、および、0.05~0.1  $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpRL-tkを、0.35  $\mu$ l/ウェルのリポフェクチン(GIBCO-BRL)またはリポフェクタミン(LGIBCO-BRL)を用いて、無血清培地中にて細胞に導入した。1ウェルあたりの培地量は200  $\mu$ lとした。導入方法は添付説明書に従った。各細胞をトランスフェクション培地中で5時間培養後に10% 活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清含有培地に交換し、翌日まで培養を続けた。次いで、 $\beta$ -エストラジオール(和光純薬社製)をDMSO(関東化学)に溶解しイーグルMEM培地に溶かし、上述の細胞に添加した。 $\beta$ -エストラジオール終濃度は10 pMから100 nMの範囲とした。 $\beta$ -エストラジオール添加後の1ウェルあたりの培地量は1 mlとした。 $\beta$ -エストラジオールを添加してから約28時間培養後、培地を除去し、 $\beta$ -エストラジオールに曝露した細胞をPBS(-)で2回洗浄した。ピッカジーンデュアルキット(東洋インキ)中の細胞溶解剤を超純水で5倍希釈したものを1ウェルあたり50  $\mu$ l添加し、室温で30分間放置して細胞を溶解した。方法はキットの添付説明書に従った。細胞溶解液10  $\mu$ lを白色96ウェルマルチウェルプレート(燐光測定用、ベルトールド、ドイツ)に移し、キット中の発光基質2種(ルシフェリン、セランテラジン)を順次添加し、それぞれの発光量をルミノメーター(ベルトールド、LB96P)で測定した。はじめに添加する発光基質はレポータープラスミドERE-tk-pGL由来のホタルルシフェラーゼによる発光を測定するために用い、後で添加する発光基質はコントロールレポータープラスミドpRL-tk由来のシーバシールルシフェラーゼによる発光を測定するために用いた。前者の発光量は化学物質が遺伝子の転写活性にあたえる影響を反映している。また、後者の発光量は内部標準として個々の実験ワークを補正するために用いる。

其施例4に記載のレポーター遺伝子において、トランス  
フェクションの際の各ウエルへのプラズミドの添加量  
と、リポフェクションまたはリサフェクタミックスの添加量に  
ついて検討した。まず、各ウエルに、プラズミド (10- $\mu$ g)

14

(GL-3)を $0.2\mu\text{g}$ から $1.2\mu\text{g}$ 、リポフェクチンまたはリポフェクタミンを $0.2\mu\text{l}$ から $0.8\mu\text{l}$ の範囲で添加してトランスフェクションを行い、得られた細胞を培養して、実施例6記載の方法に準じてルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図5に示した。リポフェクチンを用いた場合には、リポフェクチン $0.4\mu\text{l}$ とプラスミド $0.4\mu\text{g}$ を加えたときに、リポフェクタミンを用いた場合は、リポフェクタミンを $0.6\mu\text{l}$ とプラスミド $0.4\mu\text{g}$ 加えたときに、それぞれ最も高いルシフェラーゼ活性が認められた。次に、リポフェクチンまたはリポフェクタミン添加量について更に詳細に検討した。すなわち、各ウェルに加えるプラスミド量( $0.4\mu\text{g}$ )を固定し、リポフェクチンはウェル当たり $0.3\sim 0.55\mu\text{l}$ の範囲で、とりポフェクタミンはウェル当たり $0.4\sim 0.9\mu\text{l}$ の範囲で添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果を図6に示した。リポフェクチンを $0.35\mu\text{l}$ 加えた場合、または、リポフェクタミンを $0.6\mu\text{l}$ 加えた場合にそれぞれ最も高いルシフェラーゼ活性を認めた。この結果を基に、リポフェクチンとリポフェクタミンの添加量をそれぞれ $0.35\mu\text{l}$ と $0.6\mu\text{l}$ に固定して、再度プラスミドの添加量を詳細に検討した。その結果を図7に示した。プラスミドを $0.4\sim 0.6\mu\text{g}$ を加えた場合に最も高いルシフェラーゼ活性が認められた。以上の結果を基に、レポーターアッセイにおける各ウェルに添加する最適なプラスミドの量を $0.4\mu\text{g}\sim 0.6\mu\text{g}$ 、リポフェクチンの量を $0.35\mu\text{l}$ 、リポフェクタミンの量を $0.6\mu\text{l}$ と決定した。

【0018】実施例8 (β-エストラジオールによる  
反応性の確認)

実施例6記載の方法および実施例7で得られた最適条件下に、HeLa細胞における $\beta$ -エストラジオール ( $E_2$ ) のエストロゲンレセプター活性化能を測定した。ウェル内の $\beta$ -エストラジオールの終濃度が10pM から50 $\mu$ M となる条件でルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図8と9に示した。100pM以上でルシフェラーゼ活性の上昇を認め、1nMでの活性は最大に達した。 $\beta$ -エストラジオール50 $\mu$ Mでは活性の低下が認められたがこれは細胞毒性によるものであると思われる。

【0019】実施例9（化学物質のエストロゲン様作用の測定）

実施例6の方法および実施例7の結果で得られた最適条件下に、HeLa細胞におけるビスフェノールA、p-ノニルフェノール、酢酸トリブチルすず、またはフタル酸ジ-*n*-ブチルエチルヘキシルのエストロゲンレセプター活性化能を測定した。アッセイにおける各被験化学物質の終濃度は、10<sup>-6</sup> M、10<sup>-7</sup> M、10<sup>-8</sup> M、10<sup>-9</sup> M、10<sup>-10</sup> M、10<sup>-11</sup> M、10<sup>-12</sup> M、10<sup>-13</sup> M、10<sup>-14</sup> M、10<sup>-15</sup> M、10<sup>-16</sup> M、10<sup>-17</sup> M、10<sup>-18</sup> M、10<sup>-19</sup> M、10<sup>-20</sup> M、10<sup>-21</sup> M、10<sup>-22</sup> M、10<sup>-23</sup> M、10<sup>-24</sup> M、10<sup>-25</sup> M、10<sup>-26</sup> M、10<sup>-27</sup> M、10<sup>-28</sup> M、10<sup>-29</sup> M、10<sup>-30</sup> M、10<sup>-31</sup> M、10<sup>-32</sup> M、10<sup>-33</sup> M、10<sup>-34</sup> M、10<sup>-35</sup> M、10<sup>-36</sup> M、10<sup>-37</sup> M、10<sup>-38</sup> M、10<sup>-39</sup> M、10<sup>-40</sup> M、10<sup>-41</sup> M、10<sup>-42</sup> M、10<sup>-43</sup> M、10<sup>-44</sup> M、10<sup>-45</sup> M、10<sup>-46</sup> M、10<sup>-47</sup> M、10<sup>-48</sup> M、10<sup>-49</sup> M、10<sup>-50</sup> M、10<sup>-51</sup> M、10<sup>-52</sup> M、10<sup>-53</sup> M、10<sup>-54</sup> M、10<sup>-55</sup> M、10<sup>-56</sup> M、10<sup>-57</sup> M、10<sup>-58</sup> M、10<sup>-59</sup> M、10<sup>-60</sup> M、10<sup>-61</sup> M、10<sup>-62</sup> M、10<sup>-63</sup> M、10<sup>-64</sup> M、10<sup>-65</sup> M、10<sup>-66</sup> M、10<sup>-67</sup> M、10<sup>-68</sup> M、10<sup>-69</sup> M、10<sup>-70</sup> M、10<sup>-71</sup> M、10<sup>-72</sup> M、10<sup>-73</sup> M、10<sup>-74</sup> M、10<sup>-75</sup> M、10<sup>-76</sup> M、10<sup>-77</sup> M、10<sup>-78</sup> M、10<sup>-79</sup> M、10<sup>-80</sup> M、10<sup>-81</sup> M、10<sup>-82</sup> M、10<sup>-83</sup> M、10<sup>-84</sup> M、10<sup>-85</sup> M、10<sup>-86</sup> M、10<sup>-87</sup> M、10<sup>-88</sup> M、10<sup>-89</sup> M、10<sup>-90</sup> M、10<sup>-91</sup> M、10<sup>-92</sup> M、10<sup>-93</sup> M、10<sup>-94</sup> M、10<sup>-95</sup> M、10<sup>-96</sup> M、10<sup>-97</sup> M、10<sup>-98</sup> M、10<sup>-99</sup> M、10<sup>-100</sup> M、10<sup>-101</sup> M、10<sup>-102</sup> M、10<sup>-103</sup> M、10<sup>-104</sup> M、10<sup>-105</sup> M、10<sup>-106</sup> M、10<sup>-107</sup> M、10<sup>-108</sup> M、10<sup>-109</sup> M、10<sup>-110</sup> M、10<sup>-111</sup> M、10<sup>-112</sup> M、10<sup>-113</sup> M、10<sup>-114</sup> M、10<sup>-115</sup> M、10<sup>-116</sup> M、10<sup>-117</sup> M、10<sup>-118</sup> M、10<sup>-119</sup> M、10<sup>-120</sup> M、10<sup>-121</sup> M、10<sup>-122</sup> M、10<sup>-123</sup> M、10<sup>-124</sup> M、10<sup>-125</sup> M、10<sup>-126</sup> M、10<sup>-127</sup> M、10<sup>-128</sup> M、10<sup>-129</sup> M、10<sup>-130</sup> M、10<sup>-131</sup> M、10<sup>-132</sup> M、10<sup>-133</sup> M、10<sup>-134</sup> M、10<sup>-135</sup> M、10<sup>-136</sup> M、10<sup>-137</sup> M、10<sup>-138</sup> M、10<sup>-139</sup> M、10<sup>-140</sup> M、10<sup>-141</sup> M、10<sup>-142</sup> M、10<sup>-143</sup> M、10<sup>-144</sup> M、10<sup>-145</sup> M、10<sup>-146</sup> M、10<sup>-147</sup> M、10<sup>-148</sup> M、10<sup>-149</sup> M、10<sup>-150</sup> M、10<sup>-151</sup> M、10<sup>-152</sup> M、10<sup>-153</sup> M、10<sup>-154</sup> M、10<sup>-155</sup> M、10<sup>-156</sup> M、10<sup>-157</sup> M、10<sup>-158</sup> M、10<sup>-159</sup> M、10<sup>-160</sup> M、10<sup>-161</sup> M、10<sup>-162</sup> M、10<sup>-163</sup> M、10<sup>-164</sup> M、10<sup>-165</sup> M、10<sup>-166</sup> M、10<sup>-167</sup> M、10<sup>-168</sup> M、10<sup>-169</sup> M、10<sup>-170</sup> M、10<sup>-171</sup> M、10<sup>-172</sup> M、10<sup>-173</sup> M、10<sup>-174</sup> M、10<sup>-175</sup> M、10<sup>-176</sup> M、10<sup>-177</sup> M、10<sup>-178</sup> M、10<sup>-179</sup> M、10<sup>-180</sup> M、10<sup>-181</sup> M、10<sup>-182</sup> M、10<sup>-183</sup> M、10<sup>-184</sup> M、10<sup>-185</sup> M、10<sup>-186</sup> M、10<sup>-187</sup> M、10<sup>-188</sup> M、10<sup>-189</sup> M、10<sup>-190</sup> M、10<sup>-191</sup> M、10<sup>-192</sup> M、10<sup>-193</sup> M、10<sup>-194</sup> M、10<sup>-195</sup> M、10<sup>-196</sup> M、10<sup>-197</sup> M、10<sup>-198</sup> M、10<sup>-199</sup> M、10<sup>-200</sup> M、10<sup>-201</sup> M、10<sup>-202</sup> M、10<sup>-203</sup> M、10<sup>-204</sup> M、10<sup>-205</sup> M、10<sup>-206</sup> M、10<sup>-207</sup> M、10<sup>-208</sup> M、10<sup>-209</sup> M、10<sup>-210</sup> M、10<sup>-211</sup> M、10<sup>-212</sup> M、10<sup>-213</sup> M、10<sup>-214</sup> M、10<sup>-215</sup> M、10<sup>-216</sup> M、10<sup>-217</sup> M、10<sup>-218</sup> M、10<sup>-219</sup> M、10<sup>-220</sup> M、10<sup>-221</sup> M、10<sup>-222</sup> M、10<sup>-223</sup> M、10<sup>-224</sup> M、10<sup>-225</sup> M、10<sup>-226</sup> M、10<sup>-227</sup> M、10<sup>-228</sup> M、10<sup>-229</sup> M、10<sup>-230</sup> M、10<sup>-231</sup> M、10<sup>-232</sup> M、10<sup>-233</sup> M、10<sup>-234</sup> M、10<sup>-235</sup> M、10<sup>-236</sup> M、10<sup>-237</sup> M、10<sup>-238</sup> M、10<sup>-239</sup> M、10<sup>-240</sup> M、10<sup>-241</sup> M、10<sup>-242</sup> M、10<sup>-243</sup> M、10<sup>-244</sup> M、10<sup>-245</sup> M、10<sup>-246</sup> M、10<sup>-247</sup> M、10<sup>-248</sup> M、10<sup>-249</sup> M、10<sup>-250</sup> M、10<sup>-251</sup> M、10<sup>-252</sup> M、10<sup>-253</sup> M、10<sup>-254</sup> M、10<sup>-255</sup> M、10<sup>-256</sup> M、10<sup>-257</sup> M、10<sup>-258</sup> M、10<sup>-259</sup> M、10<sup>-260</sup> M、10<sup>-261</sup> M、10<sup>-262</sup> M、10<sup>-263</sup> M、10<sup>-264</sup> M、10<sup>-265</sup> M、10<sup>-266</sup> M、10<sup>-267</sup> M、10<sup>-268</sup> M、10<sup>-269</sup> M、10<sup>-270</sup> M、10<sup>-271</sup> M、10<sup>-272</sup> M、10<sup>-273</sup> M、10<sup>-274</sup> M、10<sup>-275</sup> M、10<sup>-276</sup> M、10<sup>-277</sup> M、10<sup>-278</sup> M、10<sup>-279</sup> M、10<sup>-280</sup> M、10<sup>-281</sup> M、10<sup>-282</sup> M、10<sup>-283</sup> M、10<sup>-284</sup> M、10<sup>-285</sup> M、10<sup>-286</sup> M、10<sup>-287</sup> M、10<sup>-288</sup> M、10<sup>-289</sup> M、10<sup>-290</sup> M、10<sup>-291</sup> M、10<sup>-292</sup> M、10<sup>-293</sup> M、10<sup>-294</sup> M、10<sup>-295</sup> M、10<sup>-296</sup> M、10<sup>-297</sup> M、10<sup>-298</sup> M、10<sup>-299</sup> M、10<sup>-300</sup> M、10<sup>-301</sup> M、10<sup>-302</sup> M、10<sup>-303</sup> M、10<sup>-304</sup> M、10<sup>-305</sup> M、10<sup>-306</sup> M、10<sup>-307</sup> M、10<sup>-308</sup> M、10<sup>-309</sup> M、10<sup>-310</sup> M、10<sup>-311</sup> M、10<sup>-312</sup> M、10<sup>-313</sup> M、10<sup>-314</sup> M、10<sup>-315</sup> M、10<sup>-316</sup> M、10<sup>-317</sup> M、10<sup>-318</sup> M、10<sup>-319</sup> M、10<sup>-320</sup> M、10

植物がないことを目視で確認した。また、被験化合物に替えてβ-エストラジオールを終濃度500pMとなるように添加した群を設定し、陽性対照とした。ビスフェノールAまたはノニルビスフェノールでは100nMで活性が上昇し



15

始め、10 $\mu$ Mでは活性化倍率は溶媒コントロール（DMSOのみ添加）の約5倍に上昇した（図10、11）。酢酸トリブチルすまたはフタル酸ジ-2-エチルヘキシルでは活性の上昇は認められなかった（図12、13）。さらに上記4種について50 $\mu$ Mでの実験も行った。その結果を図14に示した。ビスフェノールAで更なる活性の上昇を認めた。ノニルフェノールにおいては細胞に対する毒性に起因すると思われる活性の低下が認められた。

<110> Sumitomo Chemical Company Limited

<120> Estrogen receptor genes

<130> P150237

<150> JP 10/319465

<151> 1998-11-10

<160> 4

<210> 1

<211> 575

<212> PRT

<213> Oryzias latipes

<400> 1

```

Met Tyr Pro Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp
  1              5              10              15
Leu Leu Glu Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr
          20              25              30
Pro Leu Tyr Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu
      35              40              45
Thr Asn Gly Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly
      50              55              60
Pro Thr Ser Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro
      65              70              75              80
Phe Met His Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro
          85              90              95
Val Tyr Arg Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly
          100              105              110
Ser Arg Glu Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly
          115              120              125
Ala Gly Gly Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys
          130              135              140
Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met
          165              170              175
Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Lys Gly
          180              185              190

```

16

【0020】参考例1（他の細胞用いたアッセイ）

他の種類の培養細胞を選び、実施例5～9と同様の実験を行う。

【0021】

【発明の効果】メダカエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、および、化学物質の該レセプター活性化能を評価するための試験系等が提供可能となる。

【0022】

【配列表】

Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys  
 195 200 205  
 Gly Gly Val Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg  
 210 215 220  
 Arg Thr Gly Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His  
 225 230 235 240  
 Lys Thr Val His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly  
 245 250 255  
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu  
 260 265 270  
 Gln Val Leu Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser  
 275 280 285  
 Arg Gln Lys Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu  
 290 295 300  
 Leu Thr Ser Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala  
 305 310 315 320  
 Lys Lys Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu  
 325 330 335  
 Leu Leu Glu Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp  
 340 345 350  
 Arg Ser Ile His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile  
 355 360 365  
 Leu Asp Arg Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe  
 370 375 380  
 Asp Met Leu Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys  
 385 390 395 400  
 Pro Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly  
 405 410 415  
 Ala Phe Ser Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala  
 420 425 430  
 Ala Val Gln Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr  
 435 440 445  
 Ile Ser Gln Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala  
 450 455 460  
 Gln Pro Leu Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly  
 465 470 475 480  
 Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr  
 485 490 495  
 Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val  
 500 505 510  
 Arg Ala Pro Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr  
 515 520 525  
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg  
 530 535 540  
 545  
 Gln Tyr Gly Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp  
 565 570 575

<211> 1728  
 <212> DNA  
 <213> Oryzias latipes

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)... (1728)

<400> 2  
 atg tac cct gaa gag agc cgg ggt tct gga ggg gtg gct gct gtg gac 48  
 Met Tyr Pro Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp  
 1 5 10 15  
 ctt ttg gaa ggg acg tac gac tat gcc gcc ccc aac cct gcc acg act 96  
 Leu Leu Glu Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr  
 20 25 30  
 ccc ctt tac agc cag tcc agc acc ggc tac tac tct gct ccc ctg gaa 144  
 Pro Leu Tyr Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu  
 35 40 45  
 aca aac gga ccc ccc tca gaa ggc agt ctg cag tcc ctg ggc agt ggg 192  
 Thr Asn Gly Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly  
 50 55 60  
 ccg acg agc cct ctg gtg ttt gtg ccc tcc agc ccc aga ctc agt ccc 240  
 Pro Thr Ser Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro  
 65 70 75 80  
 ttt atg cat cca ccc agc cac cac tat ctg gaa acc act tcc acg ccc 288  
 Phe Met His Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro  
 85 90 95  
 gtt tac aga tcc agc cac cag gga gcc tcc agg gag gac cag tgc ggc 336  
 Val Tyr Arg Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly  
 100 105 110  
 tcc cgg gag gac acg tgc agc ctg ggg gag tta ggc gcc gga gcc ggg 384  
 Ser Arg Glu Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly  
 115 120 125  
 gct ggg ggg ttt gag atg gcc aaa gac acg cgt ttc tgc gcc gtg tgc 432  
 Ala Gly Gly Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys  
 130 135 140  
 agc gac tac gcc tct ggg tac cac tat ggg gtg tgg tct tgt gag ggc 480  
 Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly  
 145 150 155 160  
 tgc aag gcc ttc ttc aag agg agc atc cag ggt cac aat gac tat atg 528  
 Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met  
 165 170 175  
 tgc cca gcg acc aat cag tgc act att gac aga aat cga agg aag ggc 576  
 Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly  
 180 185 190  
 Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys  
 195 200 205  
 ggc ggt gtg cgc aag gac cgc att cgc att tta cgg cgt gac aaa cgg 672  
 Gly Gly Val Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg

210	215	220	
cgg aca ggc gtt ggt gat gga gac aag gtt gla aag ggt cag gag cat			720
Arg Thr Gly Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His			
225	230	235	240
aaa acg gtg cat tat gat gga agg aaa cgc agc agc aca gga gga gga			768
Lys Thr Val His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly			
245	250	255	
gga gga gga gga gga gga aga ctg tct gtg acc agc ata cct cct gag			816
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu			
260	265	270	
cag gtg ctg ctc ctc ctt cag ggc gcc gag ccc ccg ata ctc tgc tgc			864
Gln Val Leu Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser			
275	280	285	
cgt cag aag ttg agc cga ccg tac acc gag gtc acc atg atg acc ctg			912
Arg Gln Lys Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu			
290	295	300	
ctc acc agc atg gca gac aag gag ctg gtc cac atg atc gcc tgg gcc			960
Leu Thr Ser Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala			
305	310	315	320
aag aag ctc cca ggt ttt ctg cag ctg tcc ctg cac gat cag gtg ctg			1008
Lys Lys Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu			
325	330	335	
ctg ctg gag agc tgc tgg ctg gag gtg ctc atg atc ggc ctc att tgg			1056
Leu Leu Glu Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp			
340	345	350	
agg tcc atc cac tgt ccc ggg aag ctc atc ttt gca caa gac ctc atc			1104
Arg Ser Ile His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile			
355	360	365	
ctg gac agg aat gag gga gac tgc gtg gaa ggc atg acg gag atc ttc			1152
Leu Asp Arg Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe			
370	375	380	
gac atg ctg ctg gcc act gct tcc cgc ttc cgt gtg ctc aaa ctc aaa			1200
Asp Met Leu Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys			
385	390	395	400
cct gag gaa ttc gtc tgc ctc aaa gct att att tta ctc aac tcc ggt			1248
Pro Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly			
405	410	415	
gct ttt tct ttc tgc acc ggc acc atg gag cca ctt cac aac agc ggc			1296
Ala Phe Ser Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala			
420	425	430	
gcg gtt cag agc atg ctg gac acc atc aca gac gca ctc att cat tac			1344
Ala Val Gln Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr			
435	440	445	
atc agt cag tgc ggt tac ttg gcc cag gag cag gcg aga cgg cag gcc			1392
cag ccg ctc ctg ctg ctc tcc cac atc agg cac atg agc aac aaa ggc			1440
Gln Pro Leu Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly			
465	470	475	480
atg gag cac ctc tac agc atg aag tgc aag aac aaa gtc cct ctt tat			1488

Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr  
 485 490 495  
 gac ctc cta ctg gag atg ctc gat gcc cac cgc ctg cac cac ccc gtc 1536  
 Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val  
 500 505 510  
 aga gcc ccc cag tcc ttg tcc caa gtc gac aga gac cct ccc tcc acc 1584  
 Arg Ala Pro Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr  
 515 520 525  
 agc agc ggc ggg ggt gga atc gct ccc ggt tct ata tca gca tct cga 1632  
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg  
 530 535 540  
 ggc aga atc gag agt ccg agc aga ggc ccc ttt gct ccc agt gtc ctt 1680  
 Gly Arg Ile Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu  
 545 550 555 560  
 cag tat gga ggg tgg cgt cct gac tgc acc ccg gcc ctt caa gac tga 1728  
 Gln Tyr Gly Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp  
 565 570 575

<210> 3  
 <211> 620  
 <212> PRT  
 <213> Oryzias latipes

<400> 1  
 Met Ser Lys Arg Gln Ser Ser Val Gln Ile Arg Gln Leu Phe Gly Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Arg Ser Arg Ile Ser Pro Ala Ser Ser Glu Leu Glu Thr Leu  
 20 25 30  
 Ser Pro Pro Arg Leu Ser Pro Arg Asp Pro Leu Gly Asp Met Tyr Pro  
 35 40 45  
 Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp Leu Leu Glu  
 50 55 60  
 Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr Pro Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu Thr Asn Gly  
 85 90 95  
 Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Pro Thr Ser  
 100 105 110  
 Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro Phe Met His  
 115 120 125  
 Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro Val Tyr Arg  
 130 135 140  
 Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly Ser Arg Glu  
 145 150 155 160

Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr  
 180 185 190  
 Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala  
 195 200 205

Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala  
 210 215 220  
 Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly Cys Gln Ala  
 225 230 235 240  
 Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Val  
 245 250 255  
 Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg Arg Thr Gly  
 260 265 270  
 Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His Lys Thr Val  
 275 280 285  
 His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
 290 295 300  
 Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu Gln Val Leu  
 305 310 315 320  
 Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser Arg Gln Lys  
 325 330 335  
 Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu Leu Thr Ser  
 340 345 350  
 Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala Lys Lys Leu  
 355 360 365  
 Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu Leu Leu Glu  
 370 375 380  
 Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp Arg Ser Ile  
 385 390 395 400  
 His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile Leu Asp Arg  
 405 410 415  
 Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe Asp Met Leu  
 420 425 430  
 Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys Pro Glu Glu  
 435 440 445  
 Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Ala Phe Ser  
 450 455 460  
 Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala Ala Val Gln  
 465 470 475 480  
 Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr Ile Ser Gln  
 485 490 495  
 Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala Gln Pro Leu  
 500 505 510  
 Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His  
 515 520 525  
 Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu  
 530 535 540  
 Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val Arg Ala Pro  
 545 550 555 560  
 Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg Gly Arg Ile  
 580 585 590  
 Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu Gln Tyr Gly  
 595 600 605

Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp  
610 615

<210> 2  
<211> 1863  
<212> DNA  
<213> *Oryzias latipes*

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)... (1863)

<400> 2  
atg agt aag aga cag agc tcg gtg cag atc agg cag ctg ttc gga cca 48  
Met Ser Lys Arg Gln Ser Ser Val Gln Ile Arg Gln Leu Phe Gly Pro  
1 5 10 15  
gca ctc aga tcc agg atc agc cca gcc tcc tca gag ctg gag acc ctc 96  
Ala Leu Arg Ser Arg Ile Ser Pro Ala Ser Ser Glu Leu Glu Thr Leu  
20 25 30  
tcc cca cct cgc ctc tcg ccc cgt gac ccc ctc ggt gac atg tac cct 144  
Ser Pro Pro Arg Leu Ser Pro Arg Asp Pro Leu Gly Asp Met Tyr Pro  
35 40 45  
gaa gag agc cgg ggt tct gga ggg gtg gct gct gtg gac ctt ttg gaa 192  
Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp Leu Leu Glu  
50 55 60  
ggg acg tac gac tat gcc gcc ccc aac cct gcc acg act ccc ctt tac 240  
Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr Pro Leu Tyr  
65 70 75 80  
agc cag tcc agc acc ggc tac tac tct gct ccc ctg gaa aca aac gga 288  
Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu Thr Asn Gly  
85 90 95  
ccc ccc tca gaa ggc agt ctg cag tcc ctg ggc agt ggg ccg acg agc 336  
Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Pro Thr Ser  
100 105 110  
cct ctg gtg ttt gtg ccc tcc agc ccc aga ctc agt ccc ttt atg cat 384  
Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro Phe Met His  
115 120 125  
cca ccc agc cac cac tat ctg gaa acc act tcc acg ccc gtt tac aga 432  
Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro Val Tyr Arg  
130 135 140  
tcc agc cac cag gga gcc tcc agg gag gac cag tgc ggc tcc cgg gag 480  
Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly Ser Arg Glu  
145 150 155 160  
gac acg tgc agc ctg ggg gag tta gcc gcc gga gcc ggg gct ggg ggg 528  
  
ttt gag atg gcc aaa gac acg cgt ttc tgc gcc gtg tgc agc gac tac 576  
Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr  
180 185 190  
gcc tct ggg tac cac tat ggg gtg tgg tct tgt gag gcc tgc aag gcc 624

Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala	
195 200 205	
ttc ttc aag agg agc atc cag ggt cac aat gac tat atg tgc cca gcg	672
Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala	
210 215 220	
acc aat cag tgc act att gac aga aat cga agg aag ggc tgt cag gct	720
Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly Cys Gln Ala	
225 230 235 240	
tgt cgt ctt agg aag tgt tac gaa gtg gga atg atg aaa ggc ggt gtg	768
Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Val	
245 250 255	
cgc aag gac cgc att cgc att tta cgg cgt gac aaa cgg cgg aca ggc	816
Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg Arg Thr Gly	
260 265 270	
gtt ggt gat gga gac aag gtt gta aag ggt cag gag cat aaa acg gtg	864
Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His Lys Thr Val	
275 280 285	
cat tat gat gga agg aaa cgc agc agc aca gga gga gga gga gga gga	912
His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly	
290 295 300	
gga gga gga aga ctg tct gtg acc agc ata cct cct gag cag gtg ctg	960
Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu Gln Val Leu	
305 310 315 320	
ctc ctc ctt cag ggc gcc gag ccc ccg ata ctc tgc tgc cgt cag aag	1008
Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser Arg Gln Lys	
325 330 335	
ttg agc cga ccg tac acc gag gtc acc atg atg acc ctg ctc acc agc	1056
Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu Leu Thr Ser	
340 345 350	
atg gca gac aag gag ctg gtc cac atg atc gcc tgg gcc aag aag ctc	1104
Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala Lys Lys Leu	
355 360 365	
cca ggt ttt ctg cag ctg tcc ctg cac gat cag gtg ctg ctg ctg gag	1152
Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu Leu Leu Glu	
370 375 380	
agc tgc tgg ctg gag gtg ctc atg atc gcc ctc att tgg agg tcc atc	1200
Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp Arg Ser Ile	
385 390 395 400	
cac tgt ccc ggg aag ctc atc ttt gca caa gac ctc atc ctg gac agg	1248
His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile Leu Asp Arg	
405 410 415	
aat gag gga gac tgc gtg gaa ggc atg acg gag atc ttc gac atg ctg	1296
Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe Asp Met Leu	
420 425 430	
435 440 445	
ttc gtc tgc ctc aaa gct att att tta ctc aac tcc ggt gct ttt tct	1392
Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Ala Phe Ser	
450 455 460	



```

ttc tgc acc ggc acc atg gag cca ctt cac aac agc gcg gcg gtt cag 1440
Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala Ala Val Gln
465          470          475          480
agc atg ctg gac acc atc aca gac gca ctc att cat tac atc agt cag 1488
Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr Ile Ser Gln
          485          490          495
tcg ggt tac ttg gcc cag gag cag gcg aga cgg cag gcc cag ccg ctc 1536
Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala Gln Pro Leu
          500          505          510
ctg ctg ctc tcc cac atc agg cac atg agc aac aaa ggc atg gag cac 1584
Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His
          515          520          525
ctc tac agc atg aag tgc aag aac aaa gtc cct ctt tat gac ctc cta 1632
Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu
          530          535          540
ctg gag atg ctc gat gcc cac cgc ctg cac cac ccc gtc aga gcc ccc 1680
Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val Arg Ala Pro
          545          550          555          560
cag tcc ttg tcc caa gtc gac aga gac cct ccc tcc acc agc agc ggc 1728
Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr Ser Ser Gly
          565          570          575
ggg ggt gga atc gct ccc ggt tct ata tca gca tct cga ggc aga atc 1776
Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg Gly Arg Ile
          580          585          590
gag agt ccg agc aga ggc ccc ttt gct ccc agt gtc ctt cag tat gga 1824
Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu Gln Tyr Gly
          595          600          605
ggg tgc cgt cct gac tgc acc ccg gcc ctt caa gac tga 1863
Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp
          610          615          620

```

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のエストロジェンレセプター遺伝子を発現させるための発現ベクターの構築過程を示す図である。

【図2】本発明のエストロジェンレセプター遺伝子を発現させるための発現ベクターRSV-ERの構造を示す図である。pRC/RSVは構築に用いたベクターである。ERは本発明のエストロジェン遺伝子を、RSV LTRはRSVプロモーターを、pSV40はSV40プロモーターを、Neomycinはネオマイシン耐性遺伝子をそれぞれ示す。

【図3】エストロジェン応答配列とレポーター遺伝子とを含むレポータープラスミドERE-tk-pGL（図中ではERE-pGLと表示）の構築過程を示す図である。

【図4】エストロジェン応答配列とレポーター遺伝子とを含むレポータープラスミドERE-tk-pGLの構築過程を示す図である。

た配列を意味し、tk promoterはtkプロモーターを、Amp<sup>r</sup>アンピシリン耐性遺伝子を示す。

【図5】レポーターアッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションの条件を検討した結果を示す図で

ある。上段の図は、トランスフェクション試薬にリポフェクチンを使用した場合、下段の図はリポフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図6】レポーターアッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションにおいて、添加するトランスフェクション試薬の量を検討した結果を示す図である。上段の図は、リポフェクチンを使用した場合、下段の図はリポフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図7】レポーターアッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションにおいて、添加するプラスミドの量を検討した結果を示す図である。上段の図は、リポフェクチンを使用した場合、下段の図はリポフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図8】レポーターアッセイにおけるβ-エストラジオール誘導体の濃度とレポーター遺伝子の発現活性との関係を示す図である。

一発現ベクターRSV-ER、0.15μgのレポータープラスミドERE5-tk-pGL、および、0.1μgのコントロールレポータープラスミドpRL-tkを導入した細胞を試験に用いた。上段の図は、トランスフェクション試薬にリポフェクチン

ンを使用した場合、下段の図はリポフェクタミンを使用した場合の結果を示す。

【図 9】レポーターアッセイにおける $\beta$ -エストラジオールのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1 ウェルあたり0.25  $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15  $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1  $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpRL-tKをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。

【図 10】レポーターアッセイにおけるビスフェノールAのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1 ウェルあたり0.25  $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15  $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1  $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpRL-tKをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E 2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を示す。

【図 11】レポーターアッセイにおけるp-ノニルフェノールのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1 ウェルあたり0.25  $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15  $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1  $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpRL-tKをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E 2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を示す。

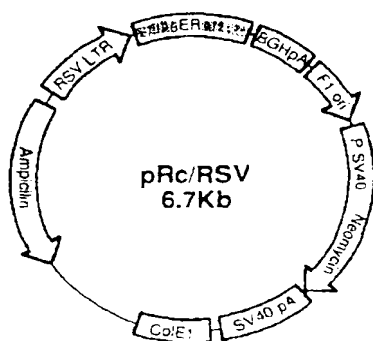
【図 12】レポーターアッセイにおける酢酸トリブチルすずのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1 ウェルあたり0.25  $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15  $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1  $\mu$ gのコントロールレポ-

タープラスミドpRL-tKをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E 2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を示す。

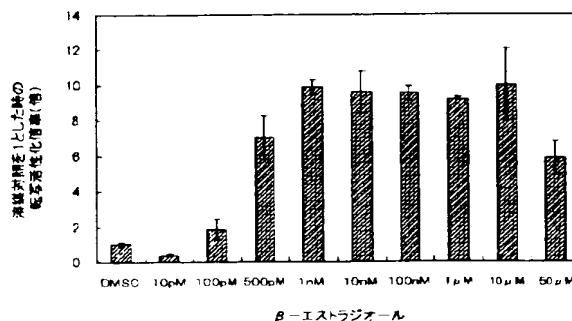
【図 13】レポーターアッセイにおけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1 ウェルあたり0.25  $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15  $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1  $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpRL-tKをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E 2は、終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を示す。

【図 14】レポーターアッセイにおける各種化合物のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1 ウェルあたり0.25  $\mu$ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15  $\mu$ gのレポータープラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1  $\mu$ gのコントロールレポータープラスミドpRL-tKをリポフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E 2は終濃度500pMの $\beta$ -エストラジオールが添加された系を、Tisは終濃度50  $\mu$ Mの酢酸トリブチルすずが添加された系を、BisAは終濃度50  $\mu$ MのビスフェノールAが添加された系を、Di-2は終濃度50  $\mu$ Mのフタル酸ジ-2-エチルヘキシルが添加された系を、Nonylは終濃度50  $\mu$ Mのノニルフェノールが添加された系を示す。顕微鏡観察により判定された死亡細胞率は、酢酸トリブチルすずが添加された系において90%以上、ビスフェノールAが添加された系において0%、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルが添加された系において90%以上、ノニルフェノールが添加された系において40%前後であった。

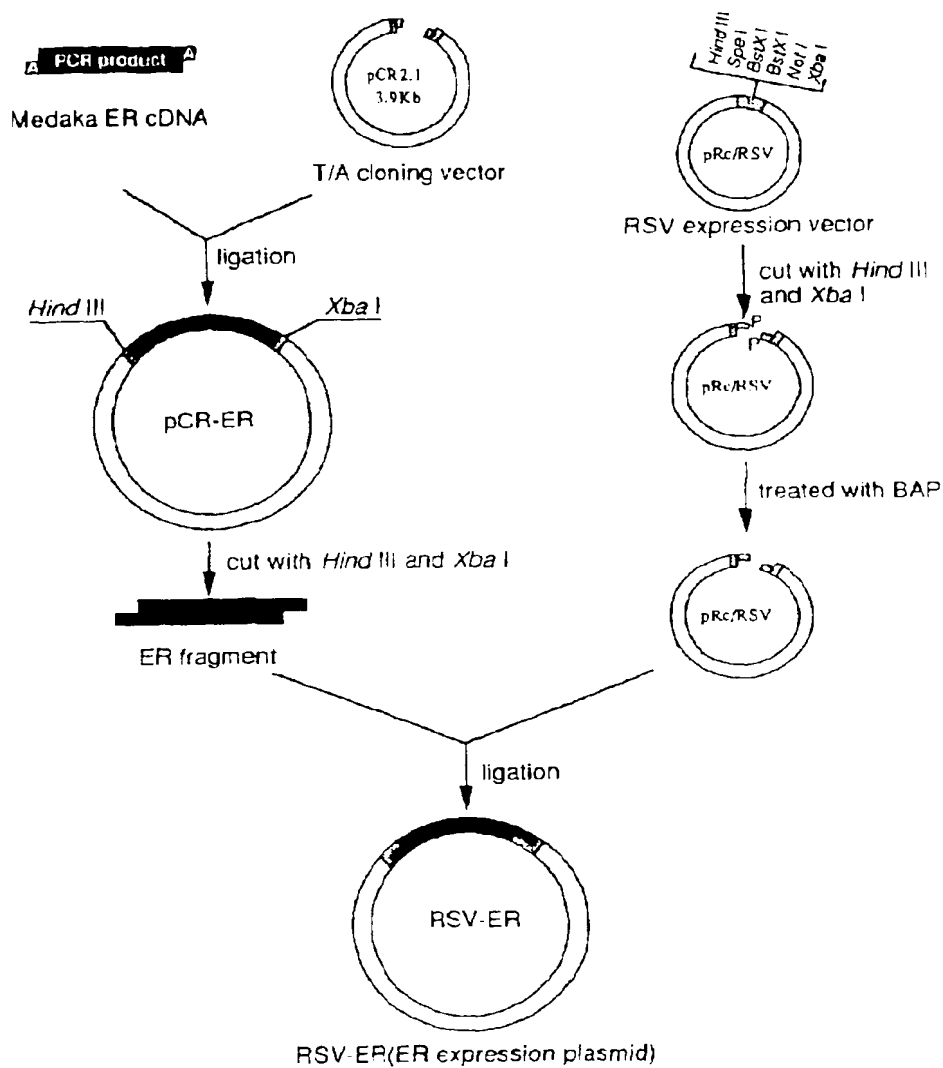
【図 2】



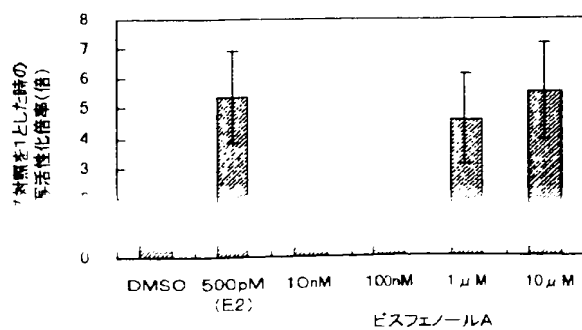
【図 9】



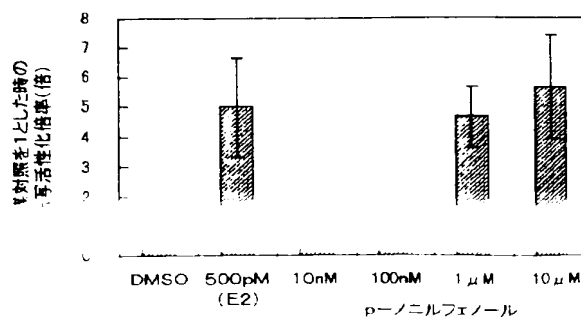
【図 1】



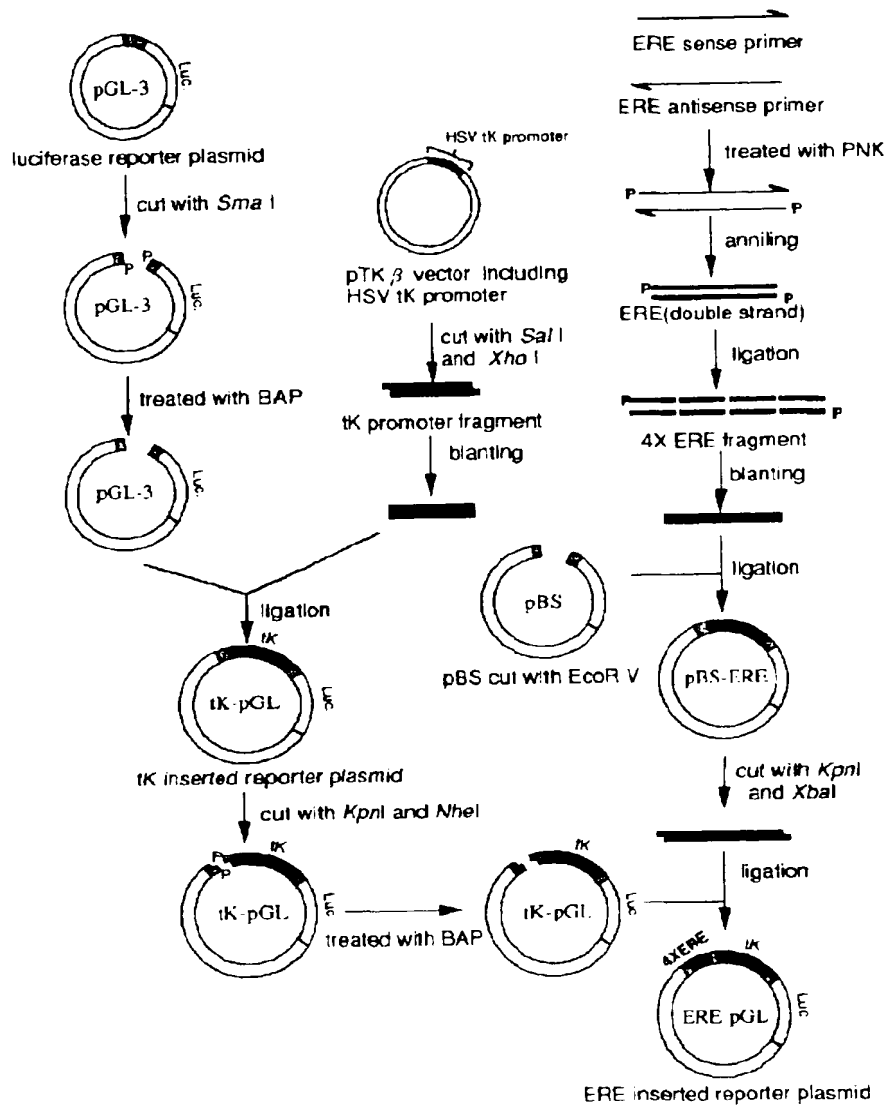
【図 10】



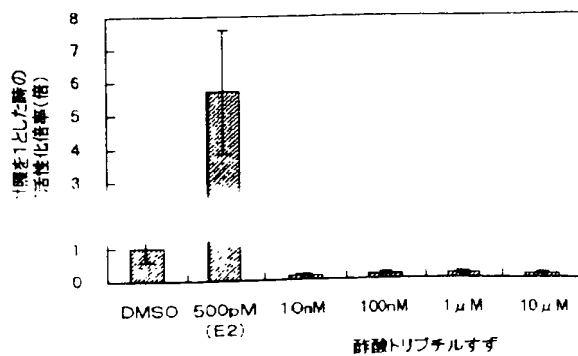
【図 11】



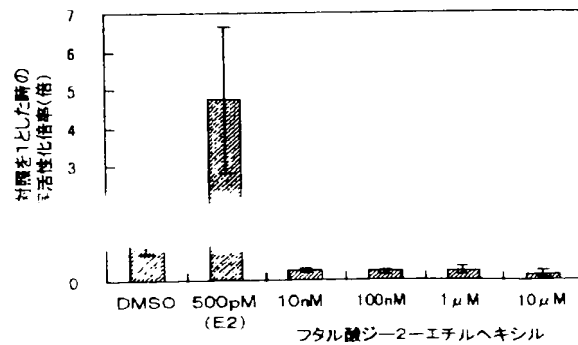
【図3】



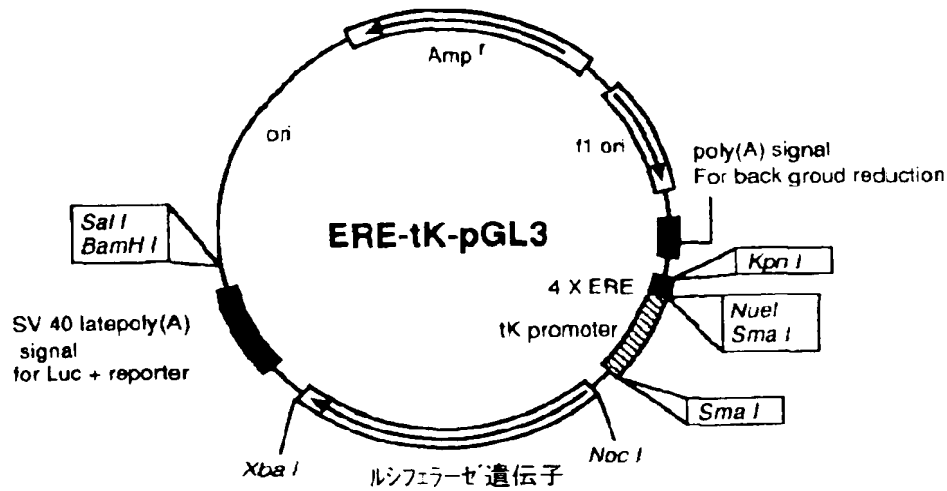
【図12】



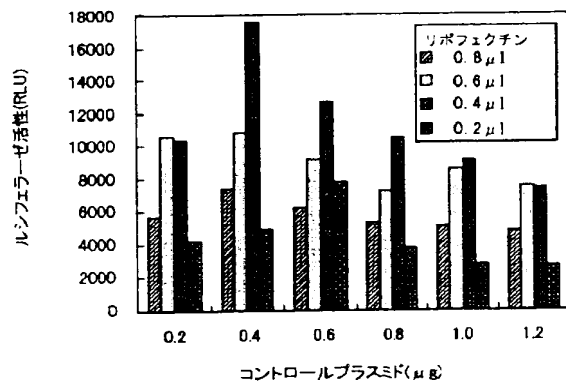
【図13】



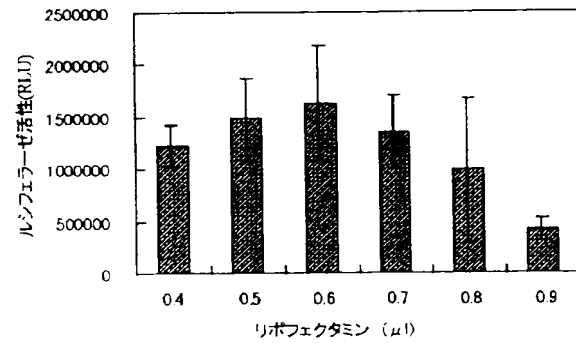
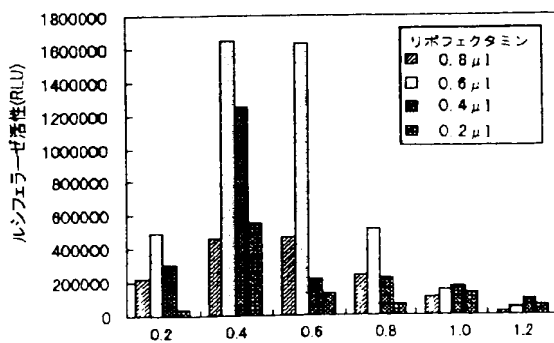
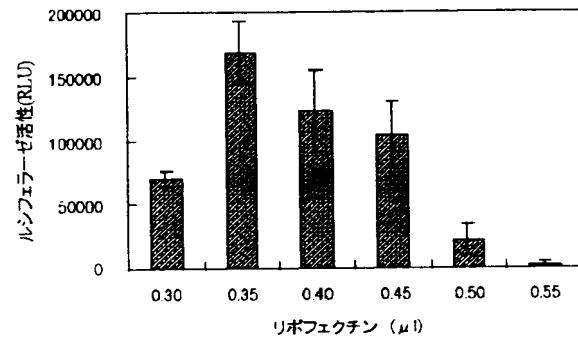
【図 4】



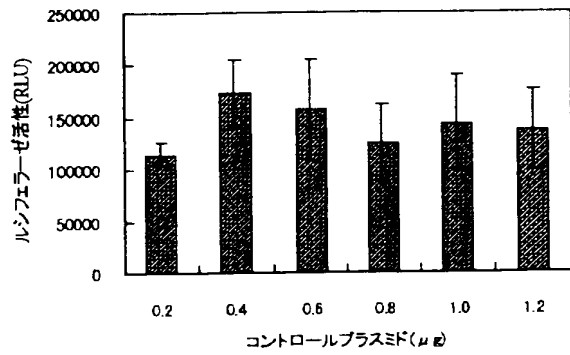
【図 5】



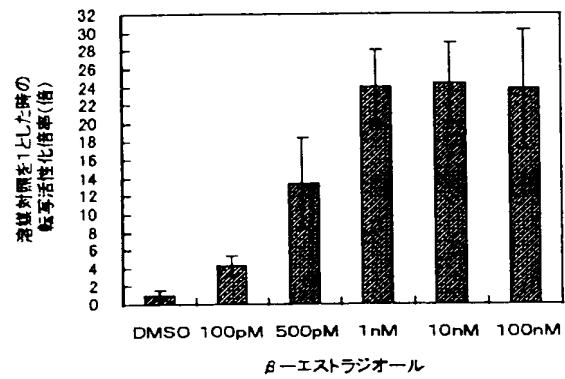
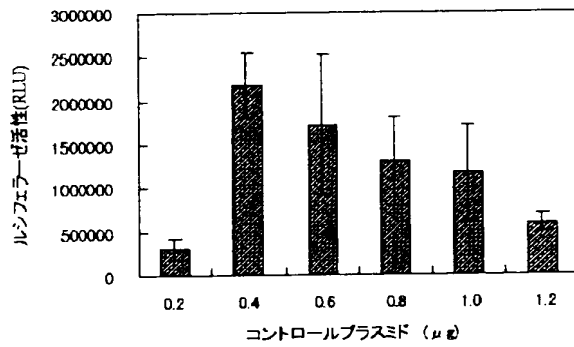
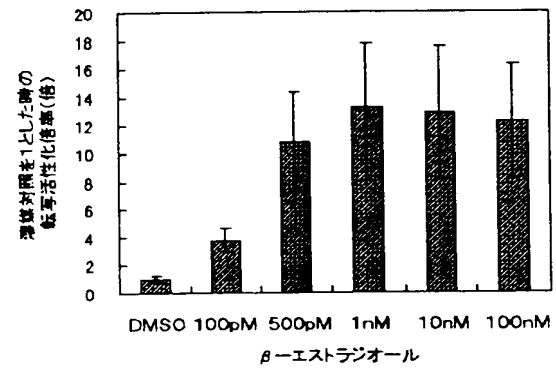
【図 6】



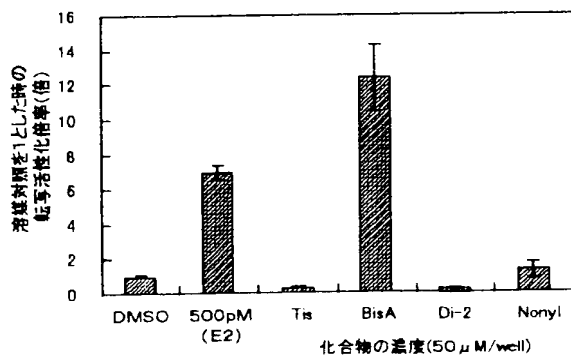
【図 7】



【図 8】



【図 14】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.

識別記号

F 1

テーマコード(参考)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

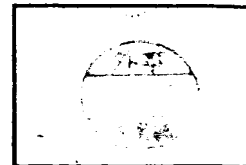
F ターム (参考) 4B024 AA11 AA17 AA20 BA63 DA02  
EA04 FA02 FA10 GA13 HA03  
HA11  
4B063 QA01 QQ22 QQ61 QQ75 QQ91  
QQ94 QR33 QR60 QR77 QR80  
QS36 QX02  
4B064 AG20 CA10 CA19 CC24 DA13  
DA16  
4B065 AA90Y AA93X AB01 AC14  
BA05 CA46  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA52  
DA50 EA50 FA72 FA74 HA06

## IDS コメント翻訳作成票

本件の IDS コメント翻訳につきまして下記の処理をお願いします。

SP No.: 00 S 12119-1 技術担当者名 伊藤さん

翻訳依頼者 (外事3課・外事1・4課) . . . . .



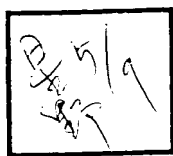
番訳期限 2003 年 5 月 13 日

翻訳文は 5sv (ネットワークコンピュータ) の T.HAGA フォルダへ入れてください

翻訳が出来上がりましたら、ワード数をご記入の上、事務担当まで  
ご返却してください。

翻訳担当者

ワード数 ( 450 )



翻訳室受領印

